

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. Oktober 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/79853 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/68,  
C12Q 1/68

(74) Anwalt: ACKERMANN, Joachim; Postfach 11 13 26,  
60048 Frankfurt (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/02235

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
28. Februar 2001 (28.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:  
100 18 464.2 14. April 2000 (14.04.2000) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; 65926 Frankfurt (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BAUER, Bettina [DE/DE]; Johannesallee 15, 65929 Frankfurt (DE). HÜLS, Christoph [DE/DE]; Danziger Weg 5, 71696 Möglingen (DE). SIMANDI, Claus [DE/DE]; Eduard-Daelen-Str. 7, 40699 Erkrath (DE).

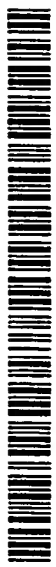
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TEST SYSTEM FOR CHARACTERIZING MODULATORS OF THE SPLICING PROCESS OF MRNA IN LIVING CELLS (IN VIVO), PRODUCTION THEREOF AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: TESTSYSTEM ZUR CHARAKTERISIERUNG VON MODULATOREN DES SPLEISSPROZESSES VON mRNA IN LEBENDEN ZELLEN (IN VIVO), DESSEN HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to an in vivo test system containing the following: (a) at least one cellular in vivo system containing at least one spliceable nucleic acid containing at least one intron; (b) the nucleic acid in (a) being spliced and the mRNA being translated; (c) and a detectable signal being induced; (d) in the presence of at least one interesting substance; (e) optionally, other auxiliary agents.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vivo-Testsystem enthaltend: (a) mindestens ein zelluläres in vivo-System enthaltend mindestens eine spleissfähige Nukleinsäure, welche mindestens ein Intron enthält; (b) wobei die Nukleinsäure in a) gespleisst und die mRNA translatiert wird (c) und ein detektierbares Signal induziert; (d) in Gegenwart mindestens einer interessierenden Substanz; (e) ggf. weitere Hilfsmittel.



WO 01/79853 A2

Testsystem zur Charakterisierung von Modulatoren des Spleißprozesses von mRNA in lebenden Zellen (in vivo), dessen Herstellung und Verwendung

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vivo-Testsystem enthaltend:

- (a) mindestens ein zelluläres in vivo - System enthaltend mindestens eine spleißfähige Nukleinsäure, welche mindestens ein Intron enthält,
- 10 (b) wobei die Nukleinsäure in a) gespleißt und die mRNA translatiert wird
- (c) und ein detektierbares Signal induziert
- (d) in Gegenwart mindestens einer interessierenden Substanz
- (e) ggf. weitere Hilfsmittel

15 Die meisten für Proteine kodierenden Gene in Eukaryonten werden in ihrer Form im Genom durch eine oder mehrere nicht für das Protein kodierende Sequenzen (Introns) unterbrochen. Bei der Transkription der genomischen DNA in die Boten-RNA (messenger RNA = mRNA) werden diese nicht-codierenden Bereiche (Introns) in das primäre Transkript übernommen. Um eine korrekte Form der mRNA zu  
20 generieren, muß diese Vorläufer-mRNA (Prä-mRNA) prozessiert werden.

Die Prozessierung der Prä-mRNA geschieht durch Entfernen der Introns und Fusion der kodierenden Bereiche (Exons). Erst dann kann ein ununterbrochen zu lesender Nukleotidstrang für die Translation im Zytoplasma zur Verfügung gestellt werden.

25 Die Bildung von mRNA in Eukaryonten erfordert daher einen sogenannten Spleißprozess, in dem die nicht kodierenden Genbereiche (Introns) aus dem primären Gentranskript entfernt werden.

Das Spleißen findet im Kern statt, bevor die mRNA aus dem Kern transportiert wird.

30 Es wird im allgemeinen in einem Zwei-Stufen-Mechanismus durchgeführt, in dem

jeweils ein Transesterifizierungsschritt beteiligt ist (Moore, J.M. et al., (1993) Splicing of precursors to messenger RNAs by the Spliceosome. In The RNA world, Edited by Gesteland R.F., Gesteland, J.F., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 303-358).

Der erste Schritt generiert ein freies 5'-Exon und eine sogenannte Lariat-Struktur des Introns, welches immer noch mit dem 3'-Exon verbunden ist. Die Lariat-Struktur enthält eine verzweigte RNA, die durch eine Veresterung des 5'-Endes des Introns mit einer 2'-Hydroxyl-Gruppe einer Ribose in einem Adenosin, das ca. 20 - 40 Nukleotide stromaufwärts des 3'-Endes des Introns gelegen ist, entsteht. Der zweite katalytische Schritt führt zu einer Ligation der Exons und der Freisetzung des Introns. Obwohl keine Nukleotide während dieser Reaktionen eingebaut werden, ist eine Energiequelle, beispielsweise ATP, für diese Katalyse notwendig (Guthrie, C. (1991) Science, 253, 157).

An dem Vorgang des mRNA-Spleißens sind mehrere Faktoren beteiligt. Zwei Klassen von Spleiß-Faktoren werden zur Zeit unterschieden. Die erste Klasse besteht aus vier in der Evolution stark konservierten Protein-RNA-Partikeln (small nuclear ribonucleoprotein particles = snRNPs): U1, U2, U4/U6 und U5, die entweder eine (U1, U2, U5) oder zwei (U4/U6) snRNA Komponenten enthalten (Moore, J.M. et al., (1993) supra; Guthrie, (1991) supra; Green, M.R. (1991). Annu. Rev. Cell Biol., 7, 559). Die zweite Klasse besteht aus bisher wenig charakterisierten Proteinen, die nicht fest an die snRNPs gebunden sind und daher nicht-snRNP Spleiß-Faktoren genannt werden (Lamm, G.M. & Lamond, A.J. (1993) Biochim. Biophys. Acta, 1173, 247; Beggs, J.D. (1995), Yeast splicing factors and genetic strategies for their analysis, In: Lamond, A.I. (ed) Pre- mRNA Processing Landes, R.G. Company, Texas, pp. 79-95. Krämer, A. (1995), The biochemistry of pre-mRNA splicing. In: Lamond, A.I. (ed), Pre-mRNA Processing. Landes, R.G. Company, Texas, pp. 35-64).

Die Zusammensetzung der snRNPs ist am besten in HeLa-Zellen untersucht (Will, C.L. et al., (1995) Nuclear pre-mRNA splicing. In: Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. (eds). Nucleic Acids and Molecular Biology. Springer Verlag, Berlin, pp. 342-372). Bei relativ geringen Salzkonzentrationen, bei denen Kern-Extrakte aus HeLa-Zellen das Spleißen von Prä-mRNA in vitro bewirken können, liegen die snRNPs in einem 12S U1 snRNP, einem 17S U2 snRNP und einem 25S [U4/U6.U5] tri-snRNP

Komplex vor. Bei höheren Salzkonzentrationen (ca. 350–450 mM) dissoziiert der tri-snRNP-Komplex in einen 20S U5- und einen 12S U4/U6-Partikel. Die U4 und U6 RNAs liegen im U4/U6 snRNP über zwei intermolekulare Helices basengepaart vor (Bringmann, P. et al. (1984) EMBO J., 3, 1357; ; Hashimoto, C. & Steitz, J.A. (1984) Nucleic Acids Res., 12, 3283; Rinke, J. et al., (1985) J. Mol. Biol., 185, 721; Brow, D.A. & Guthrie, C. (1988) Nature, 334, 213).

Die snRNPs bestehen aus zwei Gruppen von Proteinen. In allen snRNPs ist die Gruppe der allgemeinen Proteine (B/B', D1, D2, D3, E, F und G) enthalten:

Zusätzlich enthält jeder snRNP spezifische Proteine, die nur in diesem enthalten sind. So enthält nach dem bisherigen Stand der Forschung der U1 snRNP drei zusätzliche Proteine (70K, A und C) und der U2 snRNP elf weitere Proteine. Der 20S U5 snRNP trägt nach bisherigem Kenntnisstand neun weitere Proteine mit einem Molekulargewicht von 15, 40, 52, 100, 102, 110, 116, 200 und 220 kDa, während der 12S U4/U6 snRNP zwei zusätzliche Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 60 und 90 kDa enthält. Der 25S tri-snRNP [U4/U6.U5] enthält fünf zusätzliche Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 15.5, 20, 27, 61 und 63 kDa. (Behrens, S.E. & Lührmann, R. (1991) Genes Dev., 5, 1439; Utans, U. et al., (1992) Genes Dev., 6, 631; Lauber, J. et al., (1996) EMBO J., 15, 4001; Will, C.L. et al. (1995), supra, Will, C.L. & Lührmann, R. (1997) Curr. Opin. Cell Biol., 9, 320–328).

Die Zusammensetzung der Spleiß-Komponenten bei *Saccharomyces cerevisiae* sind noch nicht im Detail untersucht. Biochemische und genetische Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß die Sequenzen sowohl der snRNAs als auch der snRNP-Proteine in der Evolution hoch konserviert sind (Fabrizio, P. et al., (1994) Science, 264, 261; Lauber, J. et al., (1996), supra, Neubauer, G. et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 385; Krämer, A. (1995), supra; Beggs, J.D. (1995); supra, Gottschalk, A. et al. (1998) RNA, 4, 374–393).

Um einen funktionellen Spleiß-Komplex (Spliceosom) zu bilden, werden die einzelnen Komponenten (prä-mRNA, snRNPs und nicht-snRNP-Proteine) in einem stufenweisen Prozeß zusammengeführt. Dies wird nicht nur durch Interaktionen der prä-mRNA mit den Protein-haltigen Komponenten, sondern auch durch zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den Protein-haltigen Komponenten selbst erreicht

(Moore, J.M. (1993) *supra*; Madhani, H.D. & Guthrie, C. (1994) *Annu. Rev. Genetics*, 28, 1; Nilsen, T.W. (1994) *Cell*, 65, 115). Die Prä-mRNA trägt in ihrer Sequenz spezifische Erkennungssequenzen für die unterschiedlichen Spleißkomponenten. Zunächst bindet das U1 snRNP über diese Erkennungssequenzen an die 5'-Spleiß-Region des Introns der prä-mRNA. Gleichzeitig lagern sich eine noch nicht genau bestimmte Anzahl verschiedener weiterer Faktoren (z.B. SF2/ASF, U2AF, SC35, SF1) an diesen Komplex an und kooperieren mit den snRNAs in der weiteren Formierung des Prä-Spliceosoms. Das U2 snRNP-Partikel interagiert mit der sogenannten Branch-Site im Intron-Bereich (Krämer, A. & Utans, U. (1991) *EMBO J.*, 10, 1503; Fu, X.D. & Maniatis, T. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89, 1725; Krämer, A. (1992) *Mol. Cell Biol.*, 12, 4545; Zamore, P.D. et al. (1992) *Nature*, 355, 609; Eperon, J.C. et al. (1993) *EMBO J.*, 12, 3607; Zuo, P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3363; Hodges, P.E. & Beggs, J.D. (1994) *Curr. Biol.* 4, 264; Reed, R. (1996) *Curr. Op. Gen. Dev.*, 6, 215). In einem letzten Schritt der Bildung des Spliceosoms interagiert der [U4/U6.U5] tri-snRNP und eine Anzahl bisher nicht genauer charakterisierter Proteine mit dem Prä-Spliceosom, um das reife Spliceosom zu bilden (Moore, J.M. et al., (1993) *supra*).

Für den Vorgang des Spleißens werden verschiedene Wechselwirkungen zwischen Prä-mRNA, snRNAs und sn-RNP gelöst und neue gebildet. So ist bekannt, daß vor oder während des ersten katalytischen Schritts der Spleißreaktion in den interagierenden Strukturen von U4 und U6 zwei Helices voneinander getrennt und durch neue Interaktionen Basenpaarungen zwischen U2- und U6-RNAs gebildet werden (Datta, B. & Weiner, A.M. (1991) *Nature*, 352, 821; Wu, J.A. & Manley, J.L. (1991) *Nature*, 352, 818; ; Madhani, H.D. & Guthrie, C. (1992) *Cell*, 71, 803; Sun, J.S. & Manley, J.L. (1995) *Genes Dev.*, 9, 843. Gleichzeitig wird die Bindung von U1 an die 5'Spleißstelle gelöst und die prä mRNA bindet sich an die Erkennungssequenz ACAGAG der U6 snRNA (Fabrizio, P. & Abelson, J. (1990) *Science*, 250, 404; Sawa, H. & Abelson, J. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11269; Kandels-Lewis, S. & Séraphin, B. (1993) *Science*, 262, 2035; Lesser, C.F. & Guthrie, C. (1993) *Science*, 262, 1982; Sontheimer, E.J. & Steitz, J.A. (1993) *Science*, 262, 1989; . Das U5 snRNP interagiert über seinen konservierten Loop 1 mit Exon-Sequenzen, die nahe an den 5'- und 3'-Spleißstellen gelegen sind. Dieser Vorgang scheint sequenziell abzulaufen, während der gesamte Spleiß-Prozess von

Stufe 1 zu Stufe 2 fortschreitet (M. McKeown, (1992) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 8: 133-155 Newman, A. & Norman, C. (1991) *Cell*, 65, 115; Wyatt, J.R. et al., (1992) *Genes Dev.*, 6, 2542; Cortes, J.J. et al. (1993) *EMBO J.*, 12, 5181; Sontheimer, E.J. & Steits, (1993) *supra*). Nach der Beendigung der Spleiß-Reaktion wird die reife mRNA freigesetzt und das Spliceosom dissoziiert (Moore, J. M. et al., (1993) *supra*).

Durch alternatives Spleißen können aus ein und demselben Primärtranskript verschiedene reife mRNAs gebildet werden, die für verschiedene Proteine kodieren. Dieses alternative Spleißen ist in vielen Fällen reguliert. So kann dieser Mechanismus z.B. dazu genutzt werden, von einem nicht funktionellen zu einem funktionellen Protein umzuschalten (z. B. Transposase bei *Drosophila*). Weiterhin ist bekannt, daß alternatives Spleißen gewebespezifisch durchgeführt wird. So wird z.B. die Tyrosin-Kinase, die vom src-Proto-Oncogen codiert wird, in Nervenzellen durch alternatives Spleißen in einer speziellen Form synthetisiert.

Fehlerhaft reguliertes oder ausgeführtes alternatives Spleißen kann zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Bei Patienten, die an der Grave's Krankheit leiden, ist gezeigt worden, daß durch fehlerhaftes Spleißen ein entscheidendes Enzym (Thyroperoxidase) in einer inaktiven Form entsteht (Zanelli, E. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 170, 725). Untersuchungen für die Krankheit Spinale Muskelatrophie weisen darauf hin, daß ein defektes Genprodukt des Gens SMN (Survival of motor neurons) zu einer erheblichen Störung der Bildung der snRNPs führt. Durch die Inhibierung des Spleißapparates der Muskelneuronen, kommt es zu einer Paralyse der Nervenzellen und zu einem Abbau des Muskelgewebes (Fischer, U. et al., (1997), *Cell*, 90: 1023-9; Liu, Q. et al. (1997), *Cell*, 90: 1013-21; Lefebvre, S. et al, (1997) *Nat. Genet.*, 16, 265). Bei der Metastasierung von Krebszellen scheinen unter anderem bestimmte alternative Spleißvarianten von dem membranständigen Molekül CD44 eine entscheidende Rolle zu spielen. Das CD44-Gen enthält mehrere Exons, von denen 10 nebeneinanderliegende Exons in unterschiedlicher Anordnung bei der mRNA-Generierung aus der prä-mRNA gespleißt werden. Bei Ratten Karzinomazellen wurde nachgewiesen, daß metastasierende Varianten die Exons 4 bis 7 oder 6 bis 7 tragen. Mit Hilfe von Antikörpern gegen den von Exon 6 kodierten Teil des Proteins

konnte die Metastasierung wirksam unterdrückt werden (Sherman, L., et al., (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 213: 249-269).

Fehlerhaftes Spleißen kann zu stark ausgeprägten Phänotypen des betroffenen Organismus führen. So ist bekannt, daß eine Punktmutation in einem Intron des  $\beta$ -Globin zu einer  $\beta^+$ -Thalassaemie führen kann. Durch die Punktmutation entsteht ein falscher Spleißort, der zu einem veränderten Leseraster und zu einer vorzeitigen Termination der Peptidkette führt (Weatherall, D.J. & Clegg, J.B. (1982) Cell, 29, 7; Fukumaki, Y. et al. (1982) Cell, 28, 585). Bei *Arabidopsis thaliana* Mutanten führt z. B. eine Punktmutation an der 5' Spleißstelle des Phytochrom B Gens zu einer fehlerhaften Expression des Gens. Durch diese Veränderung kann ein Intron nicht entfernt werden, welches ein Stopcodon in seiner Sequenz enthält. Die Entwicklung der Pflanzen ist gestört, da das Gen an der Phytomorphogenese beteiligt ist (Bradley, J.M. et al. (1995) Plant Mol. Biol, 27, 1133).

Bisher sind nur wenige Arbeiten bekannt geworden, in denen eine Beeinflussung von Spleißvorgängen in der Zelle beschrieben worden sind. So kann mit Hilfe von Antiseren oder monoklonalen Antikörpern gegen Komponenten des Spleißapparates die Generierung von reifer mRNA verhindert werden (Padgett, R.A. et al. (1983) Cell, 35, 10; Gattoni, R. et al. (1996) Nucleic Acid Res., 24, 2535).

Das NS1-Protein, das durch das Genom des Influenza Virus codiert wird, kann ebenfalls durch Bindung an die U6 snRNA in das Spleißen eingreifen. Das Protein bindet an die Nukleotide 27-46 und 83-101 der humanen U6 snRNA und verhindert so, daß U6 während des Ablaufs des Spleißvorganges mit den Partnern U2 und U4 interagieren kann (Fortes, P. et al. (1994) EMBO J., 13, 704; Qiu, Y. & Krug, R.M. (1995) J. Virol., 68, 2425. Darüberhinaus scheint das NS1 Protein auch über Bindung an den poly-A-Schwanz der gebildeten mRNA einen Export aus dem Kern zu verhindern (Fortes, P. et al. (1994), supra; Qiu, Y. & Krug, R.M. (1994), supra). Ähnliche Wirkungen werden von einem Genprodukt des Herpes Simplex Virus Typ 1 Genoms beschrieben. Das Protein ICP27 konnte in in vitro Experimenten das Spleißen von einer Modell-RNA ( $\beta$ -Globin-Prä-mRNA) wirkungsvoll verhindern

(Hardy, W.R. & Sandri-Goldin, R.M. (1994) J. Virol., 68, 7790). Außerdem scheinen Peptide, die aus der C-terminalen Domäne der großen Untereinheit der RNA Polymerase II generiert wurden, ebenfalls in die Spleiß-Vorgänge eingreifen zu können (Yurvey, A. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 93, 6975; WO97/20031).  
5 Der Einbau von künstlichen Nukleotidanaloga (5-Fluor-, 5-Chlor- oder 5-Bromuridin) in die zu spleißende mRNA kann ebenfalls zu einer Inhibierung des Spleißvorganges in vitro führen (Sierakowska, H. et al. (1989) J. Biol. Chem., 264, 19185; Wu, X.P. & Dolnick, B. (1993) Mol. Pharmacol., 44, 22).

10 Eine Anzahl von weiteren Untersuchungen betrifft die Wirkung von Anti-Sense-Oligonukleotiden auf das Spleißen. So scheint das Verhältnis von zwei unterschiedlichen Spleißprodukten der c-erb-Onkogen-mRNA (c-erbA-alpha 1 und 2) der Ratte durch eine weitere mRNA, rev-ErbA-alpha, reguliert zu werden. Rev-ErbA-alpha ist eine natürlich vorkommende anti-Sense-RNA, die mit der c-erbA-alpha 2  
15 mRNA aber nicht mit der c-erbA-alpha 1 mRNA paart. Das Spleißen der c-erbA-alpha prä-mRNA zur c-erbA-alpha 2 mRNA konnte durch einen Überschuß an rev-ErbA-alpha mRNA-Konstrukten, die komplementär zur 3'-Spleißstelle waren, wirkungsvoll inhibiert werden (Munroe, S.H. & Lazar, M.A., (1991) J. Biol. Chem., 266(33), 22083). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß durch Generierung von anti-  
20 sense-RNA, die an die Intron-Sequenzen der zu spleißenden mRNA binden, ebenfalls Spleißen inhibiert werden kann (Volloch, V. et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm., 179, 1600). Hodges und Crooke konnten zeigen, daß bei schwach erkannten Spleißstellen die Bindung von Oligonukleotiden ausreicht, um erfolgreich das Spleißen zu unterbinden. Werden dagegen bevorzugt erkannte Spleißstellen in  
25 die Konstrukte eingebaut, werden Oligonukleotide benötigt, die zusätzliche eine Aktivierung der RNase H bedingen können (Hodges, D. & Crooke S.T. (1995) Mol. Pharmacol., 48, 905). Eine genauere Analyse der für das Spleißen benötigten Sequenzen der prä-mRNA zeigte, daß 19 Nukleotide stromaufwärts vom Branch-Point Adenosin und 25 Nukleotide um die 3'- und 5'-Spleiß-Stelle geeignete  
30 Sequenzen zur Generierung von Antisense RNAs sind (Dominski, Z. & Kole, R. (1994) Mol. Cell Biol., 14, 7445). Insbesondere für die Hemmung von Viren wurden Untersuchungen mit Antisense Molekülen gemacht. Viren, die höhere Organismen befallen, tragen oft Intron-enthaltende Gene in ihrem Genom. So konnte gezeigt



werden, das Antisense Oligonukleotide gegen die 3'-Spleißstelle des immediate early Prä-mRNA 4/5 Gens des Herpes simplex Virus in Vero-Zellen die Replikation des Virus hemmen konnte (Iwatani, W. et al. (1996) Drug Delivery Syst., 11, 427).

5 Zur Untersuchung des Spleiß-Mechanismus wird im allgemeinen zunächst eine mRNA durch in vitro Transkription hergestellt. Hierzu werden genetische Konstrukte aus Viren, z. B. Adenoviren, oder zellulärer Strukturgenen verwendet. Derartige mRNAs enthalten alle wichtigen Strukturelemente, die für die Erkennung der mRNA durch das Spliceosom und den Ablauf des Spleißens notwendig sind. Im  
10 allgemeinen wird die mRNA radioaktiv markiert, damit man nach der Auftrennung auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgrund der charakteristischen Bandenmuster beurteilen kann, ob eine Spleißreaktion stattgefunden hat, bzw. bei welchem Reaktionsschritt eine Störung stattgefunden hat. Derartige Testsysteme sind jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig und daher nicht für das systematische  
15 Auffinden von Substanzen, die das Spleißen modulieren oder gar inhibieren können, geeignet.

Bisher wurden Spleißvorgänge nur in einigen Fällen in vivo untersucht:

20 Buckler et al. (WO92/13071) identifizieren kodierende Sequenzen durch Einfügen von unidentifizierter genomischer Säuger-DNA in ein Plasmid-Intron mit anschließender Transfektion in Säugerzellen, welche nach abgeschlossenem in vivo Spleißen mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden detektiert wurden.

25 WO98/08953 beschreibt einen Screen von Inhibitoren und Stimulatoren des ORF P genes aus Herpes simplex virus, welches mit Spleißing-Faktoren interagiert, wobei rekombinantes ORF P ein Spleißen der viralen DNA inhibiert.

30 Kang et al. (Kang, S-H., Cho, M-J. & Kole R., Biochemistry 37, 6235-6239, 1998) beschreiben transfizierte Hela Tet-Off Zellen, wobei das Plasmid ein Luciferases Gene trägt, dem ein Intron eingebaut wurde, welches wiederum eine Mutation trägt, wodurch ein korrekter Spleißvorgang bzw. die Translation der Luciferase verhindert

wird. Durch Antisense-Oligonucleotid Behandlung der Zellen kann die Luciferase Aktivität wieder hergestellt werden.

Die Spleißaktivität in kultivierten Maiszellen konnten Carle -Urioste et al. (Carle-Urioste et al., Plant Molecular Biology 26, 1785-1795 (1994)) mit zwei Vektoren untersuchen, wobei die Luciferase nur translatiert wird, falls a) spleißen unterbleibt und b) falls der Spleißvorgang korrekt ausgeführt wurde. Im Fall von a) wurde ein Startkodon in die vor dem Luciferase Gen gelegene Intronsequenz in frame mit der Luciferasesequenz kloniert; in b) befand sich das Startkodon vor der Intronsequenz, die in diesem Fall aber ein Stopkodon enthielt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Testsystem bereitzustellen, mit dem auf einfache und effektive Art und Weise eine große Anzahl von Verbindungen aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken auf ihre Wirkung beim Spleißen von Nukleinsäuren in der lebenden Zelle bzw. zellulären "in vivo" System untersucht werden können.

Die deutsche Patentanmeldung 199 09 156.0 offenbart eine technische Lehre, die es ermöglicht auf effektive Art und Weise eine große Anzahl von Verbindungen aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken auf ihre Wirkung beim Spleißen von Nukleinsäuren in einem High throughput System "in vitro" zu identifizieren. Die vorliegende Erfindung nimmt auf diesen Offenbarungsgehalt ausdrücklich Bezug. Besonders bevorzugt werden solche interessierende Substanzen in das "in vivo" Testsystem eingesetzt, welche in einem "in vitro" Assay bereits erfolgreich als Modulator identifiziert wurden.

Es besteht ein großes Bedürfnis solche Substanzen, insbesondere auf ihre modulierende, vorzugsweise inhibierende, Wirkung "in vivo" zu identifizieren und zu verifizieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Testsystem enthaltend

- (a) mindestens ein zelluläres in vivo - System enthaltend mindestens eine spleißfähige Nukleinsäure, welche mindestens ein Intron enthält,

- (b) wobei die Nukleinsäure in a) gespleißt und die mRNA translatiert wird
- (c) und ein detektierbares Signal induziert
- (d) in Gegenwart mindestens einer interessierenden Substanz
- (e) ggf. weitere Hilfsmittel

5

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Spleiß- und Translationsprodukt nach c) mindestens ein Protein, welches in der Zelle sowie in Zellkompartimenten als auch auf der Zelloberfläche exprimiert oder sekretiert werden kann und ein Signal induziert. Dieses induzierte Signal kann auf einfache

10 Weise, vorzugsweise optisch, biochemisch, chemisch oder physikalisch im weitesten Sinne detektiert oder analysiert werden.

15

Die Detektion schließt beispielsweise eine optisch detektierbare veränderte Wellenlänge (Farbumschlag), veränderte Lichtintensität und Anregbarkeit mittels

15 distinkter Wellenlängen (UV, Fluoreszenz) ein. Ebenfalls optisch detektierbar sind morphologische Veränderung (Zellgröße, - Form, - Oberflächenstruktur, Wachstumsverhalten). Unter die Möglichkeit der chemischen, biochemischen und physikalischen Detektion fallen ebenfalls Nachweismöglichkeiten aufgrund des induzierten Signals mittels primärer oder sekundärer Reaktionen. Hinreichendes

20 Kriterium ist die maßgebliche Kausalität zwischen der Signalinduktion und der Detektion. Vorzugsweise sind zugänglich solche Parameter wie pH - Wert Änderungen, Interaktion von Biomolekülen und andere dem Fachmann leicht zugängliche Parameter. Daher sind ebenfalls Signalinduktionen über Signalketten und Signaltransduktionen ausführbar und im Rahmen dieser Erfindung einbezogen.

25

In einer weiteren Ausführungsform kann die Detektion mittels einer spezifische Sonde erfolgen. Besteht das zu detektierende Signal beispielsweise in einer Zelloberflächenstruktur kann der Nachweis durch die Reaktion dieser Struktur mit einem weiteren biologischen oder chemischen Molekül erfolgen. Ausführbar sind

daher Interaktionen an der Zelloberfläche wie eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung, Wechselwirkung mit Glykoproteinstrukturen, Antikörpern usw..

Das detektierbare Signal kann daher in einer weiteren Ausführungsform auch  
5 Element der intrazellulären Signaltransduktion sein. So bringt die Expression von onkogenen Ras, vorzugsweise in seiner konstitutiv aktiven Mutante Ras(G12V), eine morphologische Veränderung der Zelle in Form von Neuritenauswuchs nach Bindung von des Wachstumsfaktors NGF (nerve growth factor) hervor.

10 In einer weiteren Ausführungsform kann das Signal als morphologische Veränderungen des Actin-Cytoskelletts hervorgerufen durch dominant negative Mutanten des Rac/Rho-Pathway beobachtet werden. So löst die Expression von Rho(G12V) eine Assemblierung von kontraktilen Aktin-Myosin-Filamenten (sogenannten "stress fibers") innerhalb der Zelle aus, die Expression durch  
15 Rac(G12V) induziert veränderte Oberflächenstrukturen der Zelle, welche in Form von Lamellipodia und einer gekräuselten Membranoberfläche ("membrane ruffling") zu beobachten sind und Cdc42(G12V) löst die Ausbildung von Filopodien, actinreichen Oberflächenausstülpungen, aus (Hall; Science 279, 509 (1998)).

20 Im Sinne der Erfindung bedeutet spleißfähige Nukleinsäure, eine Nukleinsäure, die in einem zellulären "in vivo" System erkannt wird und dem Spleißvorgang unterliegt. Daher enthalten die spleißfähigen Nukleinsäuren mindestens ein Intron, welches in Abhängigkeit des verwendeten zellulären in vivo System als solches erkannt und gespleißt wird. Daher bedeutet Intron eine nicht kodierende Sequenz, welche  
25 gespleißt wird, aufgrund der erkennenden Consensus- Sequenzen im zellulären "in vivo" System. Solche Consensus Sequenzen sind in der Hefe: /GUAUGU in der 5'-Spleißstelle, YAG/G in der 3'-Spleißstelle und UACUAAC im Verzweigungspunkt (branchpoint); im Menschen: AG/GURAGU in der 5'Spleißstelle, YAG/ in der 3'-Spleißstelle und YNYURAC im Verzweigungspunkt (branchpoint). Die  
30 unterstrichenen Nukleotide sind streng konserviert. Ganz besonders bevorzugt ist ein Intron, welches endständig über Consensus-Sequenzen mit zwei Exons ligiert ist.

Unter "in vivo" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Umsetzung, d.h. eine Reaktion, verstanden, die innerhalb einer lebenden Zelle abläuft.

Zelluläre "in vivo" Systeme im Sinne der Erfindung sind spleißfähige Eukaryonten und zwar vorzugsweise Einzeller. Ganz besonders bevorzugt sind Zelllinien aus  
5 Säugetieren - einschließlich humaner Zelllinien (wie HeLa-Zelllinie) oder Hefen einzusetzen.

Besonders bevorzugt sind die dem Fachmann bekannten Proteine, die ein optisches Signal induzieren, sowie Reportermoleküle wie die Fluoreszenzproteine GFP (green  
10 fluorescent protein aus *Aequorea victoria*) und dessen Varianten YFP (yellow fluorescent protein), BFP (blue fluorescent protein), CFP (cyan fluorescent protein) und andere, die von Reportergenen kodiert werden.

Ganz besonders bevorzugt sind daher spleißfähige Nukleinsäuren gemäß den  
15 Merkmalen (a) - (c), die Merkmal (a) repräsentieren und für ein optisch detektierbares Signal kodieren - (b) und (c) - und zwar stellvertretend für derartige Reportermoleküle:

SEQ ID No. 1 stellt eine für GFP-Actin kodierende Nukleinsäure dar, enthaltend  
20 eine Exon-Sequenz von Nukleotid 1 - 171, eine Intron-Sequenz von 172 - 483 und eine Exon-Sequenz von 483 - 1201 sowie Consensussequenzen von 172 - 177 und 478 - 481 sowie 357 - 363.

SEQ ID No. 2 stellt eine für GFP-MINX kodierende Nukleinsäure dar, enthaltend  
25 eine Exon-Sequenz von Nukleotid 1 - 171, eine Intron-Sequenz von 172 - 290 und eine Exon-Sequenz von 291 - 837, sowie Consensussequenzen von 171 - 177, und 259 - 263 sowie 288 - 290.

Die beanspruchten spleißfähigen Nukleinsäuren enthalten mindestens ein  
30 künstliches Intron, wie sie im Fall SEQ ID No. 1 (enthaltend Actin) in Hefe und im Fall SEQ ID No. 2 von Säugetierzellen und Humanzellen (enthaltend MINX) erkannt werden können. Als weitere verwendbare Introns samt Consensussequenzen sind ausdrücklich ebenfalls solche mit einbezogen, die ohnehin in der genomischen DNA

eines Organismus enthalten sind, vorzugsweise solche des eingesetzten zellulären in vivo System.

Diese Nukleinsäuren können sowohl als RNA als auch DNA vorliegen.

5 Zur Einbringung der spleißfähigen Nukleinsäure gemäß Merkmal (a) in das zelluläre "in vivo" System wird bevorzugt ein induzierbares Expressionssystem verwendet, das käuflich erhältlich ist und zwar, z.B.: das tet-off & tet-on® Expressionssystem der Firma Clontech (the "Tet System" US. 5,464,758) oder das Ecdysone induzierbares  
10 Expressionssystem®. (Invitrogen BV, Groningen, NL) für die induzierbare Expression in Säugerzellen und den pYES2 Expressionsvektor (Invitrogen supra) oder der pESC Vektor (Stratagene) für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Die interessierende bzw. zu untersuchende Substanz kann ausgewählt werden aus einer großen Anzahl von Verbindungen aus chemischen oder natürlichen Substanzbibliotheken beispielsweise Naturstoffe im weitesten Sinne, Herbiziden, Insektiziden, Pestiziden, Antibiotika, Pharmaka, kombinatorischen Substanzbibliotheken. Ebenso kann die zu untersuchende Substanz ausgewählt sein aus einer natürlich vorkommenden, natürlich vorkommenden und chemisch  
20 modifizierten und/oder synthetischen Substanz. Solche interessierenden Substanzen werde nach üblichen Methoden in das zelluläre in vivo System eingebracht.

Daher betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Auffinden einer wirksamen Substanz, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz gemäß Merkmal (d) den Spleißprozeß  
25 moduliert und zwar inhibiert und / oder aktiviert.

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des Testsystems, wobei eine oder mehrere, gleiche oder verschiedene spleißfähige Nukleinsäuren gemäß Merkmal (a) in Anwesenheit von mindestens einer interessierenden  
30 Substanz in ein zelluläres "in vivo" System mittels eines induzierbarem Expressionssystem eingebracht (ggf. weitere Hilfsmittel) und exprimiert wird und erfindungsgemäß ein detektierbares Signal induziert wird.

Selbstverständlich erfolgen Kontrollexperimente, und zwar ohne Anwesenheit des zu spleißenden Introns in Merkmal (a) und zweitens ohne Anwesenheit der interessierenden Substanz (Doppelblindversuch).

Weitere Hilfsmittel sind nicht abschließend solche wie ATP, Tetracyclin,  
5 Ponesterone, Glucose und andere dem Fachmann bekannte geeignete Hilfsstoffe.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung, wobei mindestens eine spleißfähige Nukleinsäure gemäß (a) mit den Merkmalen (b) und (c) in Gegenwart mindestens einer interessierenden Substanz und ggf. weitere  
10 Hilfsmittel in einem zellulären in vivo System inkubiert werden und das Spleißprodukt nachgewiesen wird.

Nachfolgende Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung ohne sie auf diese Beispiele zu begrenzen.

## 15 Beispiele

### 1. Das RNA-Konstrukt

20 Die zu spleißende mRNA besteht aus mindestens zwei Exons, die durch ein Intron getrennt sind. Die Exons kodieren für ein Protein, dass nach erfolgreich durchgeführtem Spleißprozeß exprimiert wird und ein Signal ausbildet, das einen Nachweis der Spleissreaktion durch spezifische Methoden erlaubt.

25 RNA-Konstrukte mit optisch ohne Hilfsmittel zu detektierenden Signalen:

GFP-Exon 1 — Actin-Intron — GFP-Exon2 (entsprechend SEQ ID No. 1 und Figur  
1)

GFP-Exon 1 — MINX-Intron — GFP-Exon2 (entsprechend SEQ ID No. 2 und Figur  
30 2)

## 2. Konstrukte zum Nachweis mittels einer Sonde:

Zelloberflächenprotein-Exon 1 — Actin-Intron — Zelloberflächenprotein -Exon2  
5 Zelloberflächenprotein -Exon 1 — MINX -Intron — Zelloberflächenprotein -Exon2

## 3. Konstrukte zum Nachweis durch morphologische Veränderungen:

Ras(G12V)-Exon 1 — Actin-Intron — Ras(G12V)—Exon2  
10 Ras(G12V)—Exon 1 — MINX-Intron — Ras(G12V)—Exon2

## 4. Stammhaltung der Zelllinie

Zur späteren Transfektion mit den beschriebenen Reportergen-Konstrukten wurde  
15 Zellkulturen aus Säugetierzellen herangezogen. Zunächst wurden dazu  $5 \times 10^4$   
tiefgefrorenen Hela-Zellen in 10 ml Medium überführt, sedimentiert, dann in 7,5 ml  
Medium aufgenommen und in einer 25cm<sup>2</sup> Kulturflasche bei 37 °C unter Begasung  
von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Medium wurde Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium  
(Fa. Gibco) verwendet, dem 10U Penicillin/Streptavidin pro ml, 580 mg L-Glutamin  
20 pro ml, 10% Fetales Kälberserum und nicht-essentielle Aminosäuren zugesetzt  
wurden. Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt. Das Medium der inkubierten  
Zellkulturen wurde täglich erneuert. In einem Zeitraum von 48 Stunden wuchsen die  
Zellen zu einer zu 90% konfluenten Dichte heran und begannen sich vom  
Untergrund abzulösen.

25 In diesem Wachstumsstadium wurden sie in neue Inkubationsflaschen von 75cm<sup>2</sup>  
überführt. Dazu wurden die Zellen zunächst in phosphat-gepufferter Saline  
gewaschen und anschliessend mit einer Lösung aus 0,5 mg/ml Trypsin und 0,2  
mg/ml EDTA in phosphat-gepufferter Saline vom Untergrund gelöst, anschliessend  
30 die Reaktion mit 10 ml Medium abgestoppt. Die Zellen wurden bei 500 x g  
sedimentiert, mit Medium gewaschen und in 10 ml Medium aufgenommen und in  
einer Verdünnung von 1:50 in einem Volumen von 30 ml Medium in 75cm<sup>2</sup>-  
Kulturflascchen von überführt .



## 5. Transfektion

Die rekombinanten Vektoren des induzierbaren Expressionssystems wurden durch Cotrasfektion mit Hilfe des Superfect-Transfektionssystem der Firma Qiagen in die Zellen eingeschleust. Einen Tag vor dem Transfektionsprozess wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 1,6 ml Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (Fa. Gibco) je well einer 6-well-Platte ausgesät und bis zum nächsten Tag bei 37 °C und Zufuhr von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. So wurde eine Zelldichte von ca. 60% Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion erreicht. Jeweils 2 µg der gereinigten, rekombinanten DNA (4 µl einer 0,5 µg/µl-Lösung in Tris-EDTA, pH 7,4) wurden in 100 µl Medium, welches weder Serum, noch Proteine und Antibiotika enthielt, gelöst und 10 µl Superfect Transfectionsreagenz hinzugefügt. Diese Mischung wurde zur Komplexbildung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dessen wurde das Wachstumsmedium von den adherenten Zellen durch absaugen entfernt und die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen. Dann wurden 600 µl Medium 10U Penicillin/Streptavidin pro und 10% fetalem Kälberserum zur Reaktionslösung hinzugegeben, durch auf- und abpipettieren gemischt und sofort auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen wiederum 3 h bei 37 °C und unter 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde der Transfektionsmix entfernt und die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen, mit frischem Medium versorgt und 24 h inkubiert.

## 6. Transformation der Hefezellen

Zur Transformation wurde zunächst eine Vorkultur der Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* AH22ura3 (Appl. Microbiol. and Biotech., 53, 30–35 (1999)) in 20 ml YEPD über Nacht bei 28 °C angezogen. Die Hauptanzucht erfolgte in einem Kulturvolumen von 100 ml und wurde 0,01%, 0,25%, 0,05% und 0,1% mit der Vorkultur angeimpft und wiederum über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase (entsprechend einer Zelldichte von 0,5 bei OD<sub>600</sub>) pelletiert und einmal mit 10 ml 0,1M LiAc in TE pH 8.0 gewaschen, dann in 2 ml 0,1M LiAc in TE pH 8.0 aufgenommen. 100 µl Zellen wurden mit 5 µg rekombinanter Vektor-DNA, 5 µl Heringssperm-DNA (10mg/ml) und 600 µl PEG-Lösung (40% PEG 4000; 0,1M LiAc in TE pH 8.0) gemischt und 30 min bei 42 °C inkubiert, dann abzentrifugiert, in 1 ml A. bidest aufgenommen und jeweils 100 µl 1:1,

1:10 und 1:100 verdünnt ausplattiert (Agar-Medium: YNB w/o AA 6,7 g/l; Casaminoacids 10g/l; Glucose 10g/l; Agar-Agar 20g/l; Supplemente ade/ural/ lys 40mg/l) und 2 – 3 Tage bei 30 °C bebrütet.

Die Detektion positiver Transformanden erfolgte nach der PCR-Methode nach Ling et al. (Nucleic Acid Research, Vol. 23, No. 23, 4924 – 4925, 1995).

#### 7. Induktion der Expression

Die Expression der rekombinanten Gene in den Hela-Zellen wurde am Tag nach der Transfektion durch Ersetzen des Kulturmediums durch frisches Medium, welches 5 µM Ponasterone A enthielt, und anschliessende 20stündige Inkubation bei 37 °C induziert.

Zur Induktion der Expression in den Hefezellen wurden 15 ml Medium enthaltend 2% Glucose mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt, die optische Dichte der Übernacht-Kultur bestimmt und eine Kulturmenge entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 0,4 in 50 ml  $((0,4 \text{ OD}_{600}/\text{ml}) \times (50\text{ml}) / \text{OD}_{600}\text{der ÜN-Kultur}/\text{ml})$  mit 1500xg 5 min. pelletiert, anschließend in 50 ml Induktionsmedium enthaltend 2 % Galactose aufgenommen und wiederum bei 30 °C inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen wiederum pelletiert und mit A. bidest gewaschen. Anschließend wurde die Expression wie unter 6 beschrieben, nachgewiesen.

#### 8. Nachweis des Signals

Die optische Detektion des GFP (green fluorescent protein) als Nachweis des korrekt verlaufenen Spleißprozesses in der lebenden Zellen erfolgte direkt durch Bestrahlung der lebenden Zellkulturen mit der UV-Lampe. In größerem Maßstab wurde dieser Nachweis mit dem Fluoreszenz-Reader "Fluostar" (SLT Labinstrumente Deutschland GmbH) im 96-well-Format durchgeführt.

Der Nachweis der morphologischen Veränderungen des Cytoskeletts durch Expression der dominant negativen kleinen GTPasen erfolgte nach Anfärbung mit Rhodamin-Phalloidin.

Die Beobachtung des Neuritenauswuchses der mit NGF behandelten Ras(G12V) exprimierenden Zellen wurde mit dem Axiovert S100 (ZEISS) im Phasenkontrast ... durchgeführt.

## Patentansprüche

### 1. Testsystem enthaltend:

- (a) mindestens ein zelluläres in vivo - System enthaltend mindestens eine spleißfähige Nukleinsäure, welche mindestens ein Intron enthält,
- (b) wobei die Nukleinsäure in a) gespleißt und die mRNA translatiert wird
- (c) und ein detektierbares Signal induziert
- (d) in Gegenwart mindestens einer interessierenden Substanz
- (e) ggf. weitere Hilfsmittel

### 2. Testsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die spleißfähige Nukleinsäure mindestens zwei Exons enthält, die durch mindestens ein Intron getrennt sind.

### 3. Testsystem nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die spleißfähige Nukleinsäure nach (a) Consensus-Sequenzen samt Intron aus dem zellulären in vivo System umfaßt.

### 4. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das zelluläre in vivo System aus Eukaryonten, vorzugsweise einzelligen Eukaryonten, ausgewählt ist.

### 5. Testsystem nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Signal gemäß (c) optisch und / oder morphologisch und / oder biochemisch detektierbar ist.

### 6. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Translationsprodukt gemäß Merkmal (b) ein Protein und / oder eine Sonde ist.

7. Testsystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein und / oder die Sonde ausgewählt ist aus Fluoreszenzproteinen oder Zelloberflächenproteinen.
8. Testsystem nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluoreszenzprotein ausgewählt ist aus den von den Sequenzen SEQ ID. No. 1 oder SEQ ID No. 2 kodierten Proteinen oder entsprechenden Varianten, wobei SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 2 Teil des Anspruches sind.
9. Testsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die weiteren Hilfsmittel gemäß Merkmal (e) nicht abschließend ausgewählt sind aus ATP, Tetracyclin, Ponesterone, Glucose und anderen Hilfsstoffen.
10. Verfahren zur Herstellung eines Testsystems gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine spleißfähige Nukleinsäure gemäß (a) mit den Merkmalen (b) und (c) in Gegenwart mindestens einer interessierenden Substanz und ggf. weiteren Hilfsmitteln in einem zellulären in vivo System zusammengestellt werden und das Spleißprodukt nachgewiesen wird.
11. Verfahren zum Auffinden einer wirksamen Substanz unter Verwendung eines Testsystems nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz gemäß Merkmal (d) den Spleißprozeß moduliert und zwar inhibiert oder aktiviert.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die wirksame Substanz ausgewählt ist aus Naturstoffen im weitesten Sinne, Herbiziden, Insektiziden, Pestiziden, Antibiotika, Pharmaka, kombinatorischen Substanzbibliotheken.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Substanz ausgewählt ist aus einer natürlich vorkommenden,

natürlich vorkommenden und chemisch modifizierten und/oder synthetischen Substanz.

- 5 14. Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine spleißfähige Nukleinsäure gemäß (a) mit den Merkmalen (b) und (c) in Gegenwart mindestens einer interessierenden Substanz und ggf. weiterer Hilfsmittel in einem zellulären in vivo System inkubiert wird und das Spleißprodukt nachgewiesen wird.
- 10 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung eine Erbkrankheit, eine Krebserkrankung und/oder eine virale Erkrankung ist.
- 15 16. Verfahren nach den Ansprüchen 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung ausgewählt ist aus Grave's Krankheit, spinale Muskelatrophie,  $\beta$ -Thalassaemie, Krebserkrankungen in bezug auf das c-erb-Onkogen, Hepatitis C Infektion und/oder Herpes Simplex Virus Infektion.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG

<120> Testsystem zur Charakterisierung von Modulatoren des  
Spleißprozesses von mRNA in lebenden Zellen (in vivo),  
dessen Herstellung und Verwendung

<130> 200at08

<140> 10018464.2

<141> 2000-04-14

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1026

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: GFP-Actin

<400> 1

```

atgagtaaag gagaagaact ttctactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggg 60
gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagagggtg aaggatgatgc aacatacggg 120
aaacttaccc ttaaatatat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg ggtatgttct 180
agcgcttgca ccatcccatt taactgtaag aagaattgca cgggcccaat tgctcgagag 240
atttctcttt tacctttttt tactattttt cactctccca taacctccta tattgactga 300
tctgtaataa ccacgatatt attggaataa ataggggctt gaaatttga aaaaaaaaaa 360
aaactgaaat attttcgtga taagtgatag tgatattctt cttttatttg ctactgttac 420
taagtctcat gtactaacat cgattgttct attctttttg ttgctatat attatgttttag 480
ccaacacttg tcactacttt ctcttatggg gttcaatgct tttcaagata cccagatcat 540
atgaaacagc atgacttttt caagagtgcc atgccgaag gttatgtaca ggaaagaact 600
atatttttca aagatgacgg gaactacaag acacgtgctg aagtcaagtt tgaaggatgat 660
acccttggtt atagaatcga gttaaaagggt attgatttta aagaagatgg aaacattctt 720
ggacacaaat tggaatacaa ctataactca cacaatgtat acatcatggc agacaaacaa 780
aagaatggaa tcaaagttaa cttcaaaatt agacacaaca ttgaagatgg aagcgttcaa 840
ctagcagacc attatcaaca aaatactcca attggcgatg gccctgtcct ttaccagac 900
aaccattacc tgtccacaca atctgccctt tcgaaagatc ccaacgaaaa gagagaccac 960
atggtccttc ttgagtttgt aacagctgct gggattacac atggcatgga tgaactatac 1020
aatga

```

1026

<210> 2

<211> 837

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: GFP-MINX

<400> 2

```
atgagtaaaag gagaagaact ttctactgga gttgtcccaa ttcttggtga attagatggt 60
gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagaggggtg aaggtgatgc aacatacgga 120
aaacttaccc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac ctgttccatg ggtaagagcc 180
tagcatgtag aactggttac ctgcagccca agcttgctgc acgtctaggg cgcagtagtc 240
caggggtttcc ttgatgatgt catacttatc ctgtcccttt tttttccaca gccaacactt 300
gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcaagat acccagatca tatgaaacag 360
catgactttt tcaagagtgc catgcccga ggttatgtac aggaaagaac tatatttttc 420
aaagatgacg ggaactacaa gacacgtgct gaagtcaagt ttgaaggatga tacccttggt 480
aatagaatcg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa 540
ttggaatata actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaaca aaagaatgga 600
atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gaagcgttca actagcagac 660
cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 720
ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa agagagacca catggtcctt 780
cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaatga 837
```